

**BAKTERI RHIZOSFER
SEBAGAI PEREDUKSI MERKURI DAN AGENSIA HAYATI**

Dra. Endang Triwahyu Prasetyawati, MSi

BAKTERI RHIZOSFER SEBAGAI PEREDUKSI MERKURI DAN AGENSIA HAYATI

Hak Cipta © pada Penulis, hak penerbitan ada pada Penerbit UPN Press

Penulis : Dra. Endang Triwahyu Prasetyawati, MSi
Diset dengan : MS – Word Font Time New Roman 12 pt
Halaman Isi : 40
Ukuran Buku : 16,5 x 23
Cetakan I : 2009

Penerbit : UPN Press

ISBN 978-979-3100-95-1

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan monograf ini. Monograf ini disusun sebagai hasil penelitian tentang potensi bakteri Rhizosfer sebagai pereduksi logam merkuri dan agensia hayati .

Buku ini disusun guna memberikan pemahaman bahwa bakteriyang hidup di daerah rhizosfer bermacam-macam dan ada yang bermanfaat, tetapi ada juga yang merugikan. Buku ini dimulai dari eksplorasi bakteri rhizosfer yang mampu mereduksi merkuri. Setelah menemukan isolat-isolat yang berpotensi mereduksi merkuri selanjutnya dilakukan seleksi beberapa isolat yang mampu tumbuh pada medium yang mengandung merkuri dengan konsentrasi tinggi dan dilakukan identifikasi sampai ke genus. Dari isolate terpilih selanjutnya diujikan apakah berpotensi sebagai agensia hayati, yaitu mampu menekan pertumbuhan bakteri pathogen.

Penulis mengucapkan banyak terima kepada semua pihak yang telah membantu penyusunan buku ini. Penulis berharap semoga apa yang tertulis dalam buku ini dapat bermanfaat.

Surabaya, September 2009

Penulis

PENDAHULUAN

Mikroorganisme adalah kelompok makhluk hidup yang ukurannya sangat kecil, tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Macam mikroorganisme banyak dan penggolongannya pun juga bermacam-macam, ada yang berdasarkan habitatnya, cara hidupnya, kebutuhannya akan oksigen, kebutuhannya terhadap karbon dan lain sebagainya.

Berdasarkan habitatnya mikroorganisme dibedakan dalam golongan mikrobia tanah, mikrobia air, dan mikrobia udara, oleh karena itu mikroorganisme atau mikrobia bersifat ubiquitous, artinya ada di mana-mana.

Berdasarkan type selnya organisme digolongkan dalam dua golongan, yaitu prokariotik dan eukariotik. Prokariotik adalah kelompok organisme yang belum mempunyai membran inti sel, sedangkan eukariotik adalah kelompok organisme yang sudah memiliki membran inti sel.

1. Struktur Bakteri

Bakteri termasuk organisme yang bertipe sel prokariotik, sedangkan organisme yang bertipe sel eukariotik adalah fungi, protista, plantae dan animalia. Bakteri ada yang menguntungkan baik di bidang industri makanan, pertanian, perikanan dan lain sebagainya. Disamping itu juga ada yang merugikan baik di bidang industri maupun pertanian.

Bakteri pada umumnya mempunyai struktur sebagai berikut :

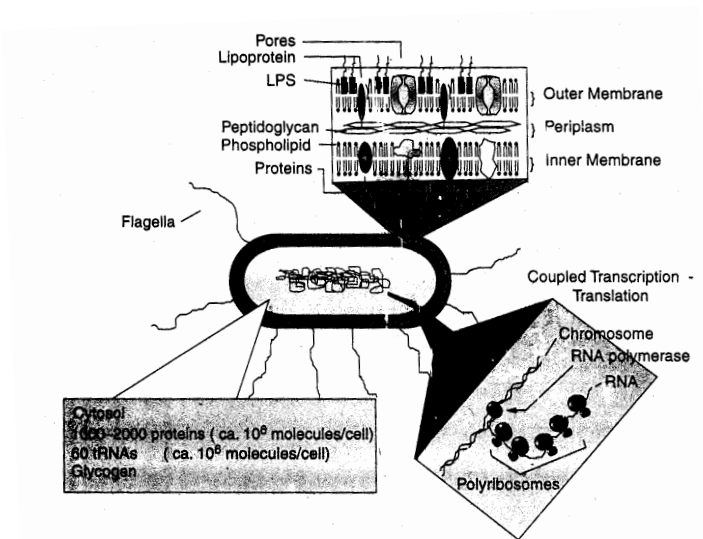
1. Mikroskopik, ukuran tubuhnya berkisar antara 0.5 – 5 μm , ada juga yang 0,3 mm.
2. Bersifat uniselluler (sel tunggal)
3. Tanpa nucleus (inti sel), cytoskeleton dan organel lain, seperti mitokondria dan kloroplas
4. Dinding sel tersusun atas peptidoglikan
5. Ada yang mempunyai alat gerak, yang disebut dengan flagella
6. Bakteri juga memiliki kromosom, ribosom dan beberapa spesies lainnya memiliki granula makanan, vakuola gas dan magnetosom.
7. Beberapa bakteri mampu membentuk endospora yang membuat mereka mampu bertahan hidup pada lingkungan ekstrim

Berdasarkan bentuknya morfologinya, bakteri dibagi menjadi tiga golongan besar, yaitu:

- Kokus (*Coccus*) adalah bakteri yang berbentuk bulat seperti bola
- Basil (*Bacillus*) adalah kelompok bakteri yang berbentuk batang atau silinder
- Spiril (*Spirillum*) adalah bakteri yang berbentuk lengkung

Berdasarkan struktur dinding selnya, bakteri dikelompokkan menjadi dua, yaitu gram positif dan gram negatif. *Gram positif* memiliki dinding sel yang terdiri atas lapisan peptidoglikan yang

tebal dan asam teichoic. *Gram negatif* memiliki lapisan luar, lipopolisakarida, terdiri atas membran dan lapisan peptidoglikan yang tipis terletak pada periplasma (diantara lapisan luar dan membran sitoplasmik) (Gambar 1)



Gambar 1. Struktur Bakteri Gram Negatif (Moat *et al*, 2002)

Metode pengecatan gram, memudahkan kita dalam mengetahui bakteri yang kita teliti termasuk gram positif atau gram negatif. Bakteri gram positif setelah dilakukan pengecatan gram akan tampak berwarna ungu di bawah mikroskop, sedangkan bakteri gram negatif akan tampak berwarna merah, karena kelompok bakteri ini disamping lapisan peptidoglikannya tipis

lapisan terluarnya terdiri dari membran yang mudah larut dengan alkohol, sehingga warna yang muncul adalah warna pembanding yaitu safranin (merah).

Banyak spesies bakteri yang mempunyai alat gerak yang disebut dengan flagel. Hampir semua bakteri yang berbentuk lengkung dan sebagian yang berbentuk batang ditemukan adanya flagel. Sedangkan bakteri kokus jarang sekali memiliki flagel. Ukuran flagel bakteri sangat kecil, tebalnya 0,02 – 0,1 mikro, dan panjangnya melebihi panjang sel bakteri. Berdasarkan tempat dan jumlah flagel yang dimiliki, bakteri dibagi menjadi lima golongan, yaitu:

- Atrik : kelompok bakteri yang tidak mempunyai flagel
- Monotrik : kelompok bakteri yang mempunyai satu flagel pada salah satu ujungnya
- Lofotrik : kelompok bakteri yang mempunyai sejumlah flagel pada salah satu ujungnya
- Amfitrik : kelompok bakteri yang mempunyai sejumlah flagel pada kedua ujungnya
- Peritrik : kelompok bakteri yang mempunyai flagel pada seluruh permukaan tubuhnya

2. Rhizosfer

Istilah rhizosfer diperkenalkan pada tahun 1904 oleh Hiltner, seorang ilmuwan Jerman untuk menunjukkan bagian tanah yang

dipengaruhi oleh perakaran tanaman (Gambar 2). Rhizosfer dicirikan oleh lebih banyaknya kegiatan mikrobiologis dibandingkan kegiatan di dalam tanah yang jauh dari perakaran tanaman (Rao,1994)



Gambar 2. Rhizosfer suatu tanaman.

Bakteri tanah banyak dijumpai di daerah Rhizosfer. Banyak bakteri tanah yang telah diteliti, berperan sebagai agensia hayati, berperan sebagai penambat N, pereduksi logam-logam berat,

senyawa-senyawa beracun dan lain sebagainya. Beberapa bakteri tanah ada yang bersifat patogen terhadap tanaman, hewan dan manusia.

Populasi mikroba dalam Rhizosfer selain mempengaruhi pertumbuhan tanaman, juga dapat meningkatkan kemampuan tanaman dalam absorpsi logam berat pada tanah tercemar. Menurut Salt *et al* (1995) ada dua upaya untuk meningkatkan kemampuan tanaman dalam mengabsorpsi logam berat pada tanah tercemar.

Pertama dengan menambahkan agen pengelut sintesis ke dalam tanah (misalnya EDTA, HEDRA). Penilaian ini telah dicoba oleh Huang *et al* (1996), yang menemukan bahwa EDTA dapat membantu penyerapan logam berat oleh tanaman. Cara ke dua adalah dengan memanfaatkan mikroba tanah penghuni daerah perakaran (Rhizobakteri).

BAKTERI RHIZOSFER PEREDUKSI MERKURI

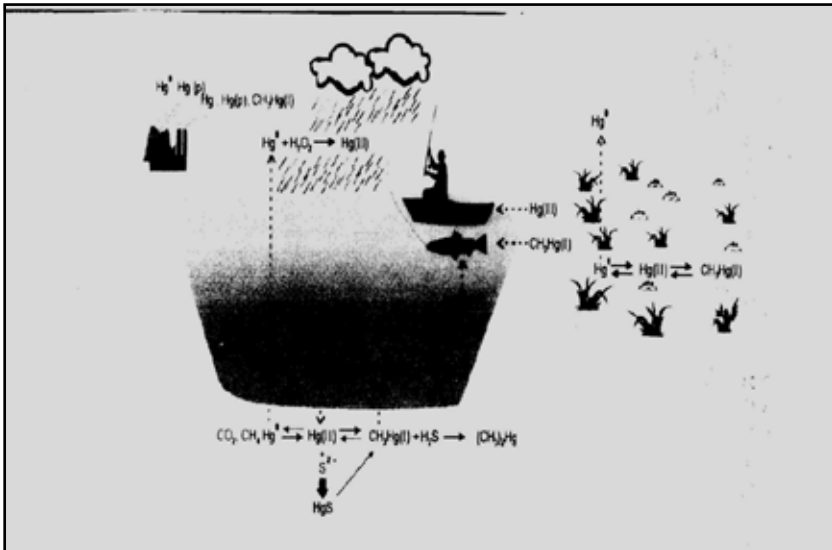
1. Keberadaan Merkuri Di Alam

Merkuri adalah logam berbentuk cair, dengan berat atom 200,6 dan mempunyai titik didih hampir 357°C atau 675°F (Madep, 2001). Keberadaannya di alam dengan konsentrasi yang relatif rendah yaitu sekitar 1 ng/l. Kegiatan beberapa industri dan penggunaan pestisida berbahan aktif merkuri menyebabkan konsentrasi merkuri meningkat (Madigan *et al*, 2000).

Merkuri di alam dapat ditemukan dalam tiga bentuk, yaitu logam merkuri (Hg^0), merkuro/merkuri anorganik (Hg_2^{2+} / Hg^{2+}) dan bentuk organik (R-Hg^+ , RHgR). Hasil pengujian toksisitas diketahui bahwa merkuri organik khususnya metil merkuri (CH_3Hg) lebih toksik dibanding bentuk merkuri yang lain (Hg^0 , Hg^+ , Hg^{2+}) Merkuri di alam mengalami siklus tertentu (Gambar 3).

Logam Merkuri di tanah bisa berubah menjadi merkuri anorganik dan merkuri organik oleh aktifitas mikrobia fotosintetis. Logam merkuri mudah menguap, dan bisa kembali ke bumi melalui hujan asam. Merkuri organik dan anorganik dapat masuk ke lingkungan perairan dan terakumulasi dalam tubuh biota air melalui rantai makanan. Di dasar perairan, adanya sulfur dapat merubah merkuri menjadi HgS , selanjutnya melalui aktifitas mikrobia

pengguna sulfur akan diubah menjadi metil merkuri (Barkay, 2001).



Gambar 3. Siklus Merkuri di alam (Barkay, 2001)

2. Detoksifikasi Merkuri Oleh Bakteri

Mikrobia terutama bakteri mampu menyesuaikan diri pada lingkungan yang tercemar logam, sehingga menjadi resisten. Mekanisme resistensi Mikrobia dapat dilakukan melalui cara-cara, sebagai berikut :

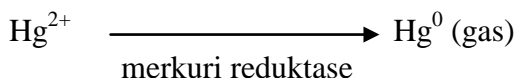
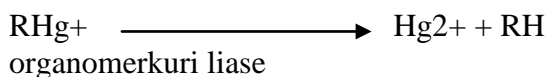
- (1) Biotransformasi (melalui oksidasi – reduksi)

- (2) Biopresipitasi (ion logam dipresipitasi pada permukaan sel melalui mekanisme mikrobial seperti efflux kation atau mengubah pH)
- (3) Biosorpsi (menggunakan biomass mikrobial alami atau rekombinan untuk adsorpsi ion metal) (Hughes & Poole, 1989).

Mekanisme detoksifikasi logam berat oleh mikrobial berlangsung sangat kompleks yang meliputi presipitasi dan kristalisasi logam berat yang terjadi pada bagian ekstraseluler dan intraseluler mikrobial (Gadd, 2000).

Resistensi bakteri terhadap merkuri anorganik dan merkuri organik merupakan akibat dari mekanisme detoksifikasi yang merupakan serangkaian usaha suatu sel bakteri menjadi resisten terhadap merkuri. Mekanisme detoksifikasi ini tidak lepas dari kerja enzim merkuri reduktase (EC.1.1.61.1) dan organomercuri liase (EC.4.99.1.2.) yang disandi oleh gen-gen yang terdapat pada plasmid dan transposon (Barkay, 1992 dan Gadd, 2000).

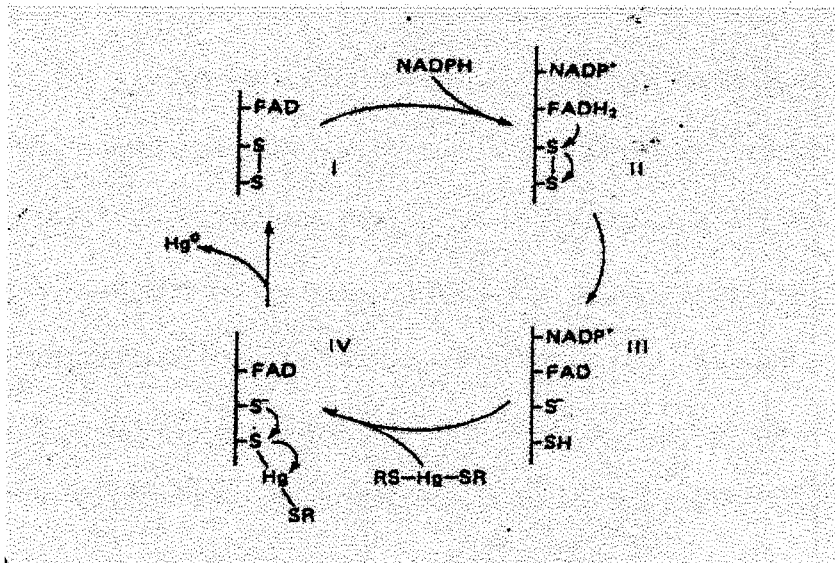
Enzim organomercuri liase bekerja dengan memutuskan ikatan karbon-merkuri seperti pada senyawa metil (CH_3Hg^+) dan senyawa etil ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) menjadi senyawa Hg^{2+} yang kemudian direduksi oleh enzim merkuri reduktase menjadi Hg_0 (gambar 4) (Hughes dan Poole, 1989).



Gambar 4. Perombakan senyawa merkuri organik menjadi merkuri anorganik secara enzimatis

Sistem detoksifikasi merkuri oleh sel bakteri yang paling umum adalah sistem terinduksi (“inducible system”) yang melibatkan dua macam enzim yaitu merkuri reduktase dan organomerkuri liase serta satu sistem pengangkutan Hg^{2+} . Ketiganya dikode oleh gen-gen yang terdapat pada plasmid dan transposon. Merkuri reduktase merupakan enzim yang bertanggung jawab terhadap reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Enzim sitoplasmik ini telah dipelajari dalam plasmid dari *Pseudomonas* sp., *E. coli* dan *S. aureus*; sebagai kofaktor adalah NADPH ataupun NADH. Enzim ini spesifik untuk merkuri dan mengandung residu sistein yang aktif melakukan reduksi oksidasi pada sisi aktifnya (Rinderle *et al*, dalam Hughes dan Poole, 1989). Penelitian terakhir menunjukkan bahwa enzim ini adalah flavoprotein dan mempunyai satu FAD.(William dan Silver dalam Hughes dan Poole, 1989). Merkuri reduktase juga dapat mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 yang kemungkinan melibatkan pemindahan elektron dari NADH ke

FAD, kemudian ke sisi aktif disulfida dan pada akhirnya ke Hg^{2+} yang terkelat. Model mekanisme ini dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Model Mekanisme Aktivitas Merkuri Reduktase dalam Mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 (Williams dan Silver dalam Hughes dan Poole, 1989).

Enzim lain yang bekerja dalam sistem detoksifikasi merkuri adalah organomerkuri liase, tetapi aktivitas enzim ini belum diketahui. Mekanisme resistensi dalam sistem detoksifikasi merkuri juga melibatkan sistem.

Kemampuan untuk tetap bertahan hidup dan berkembang biak pada habitat yang mengandung logam sangat tergantung pada kemampuan adaptasi secara genetik maupun fisiologis (Gadd, 2000). Mekanisme resistensi terhadap logam biasanya ditentukan oleh gen yang berada pada plasmid, transposon 21 dan kromosom (Barkay, 1992; Hughes & Poole 1989).

Selanjutnya dikatakan juga oleh Hughes & Poole (1989) bahwa, pengikatan logam pada permukaan sel bakteri terjadi pada sisi anionik dinding sel, khususnya

- (1) kelompok phosphodiester pada asam teikhoat;
- (2) kelompok karboksil pada peptidoglikan;
- (3) kelompok gula hidroksil pada polimer dinding sel;
- (4) kelompok amida pada rantai peptida.

Sebagian besar bakteri menghasilkan polisakarida ekstraseluler yang mempunyai muatan anionik dan berfungsi sebagai biosorben untuk kation logam (Gadd, 1990). Bioakumulasi intraseluler biasanya terjadi melalui pengikatan pada permukaan sel dan ditransport melintas membran ke bagian dalam sel. Transport intraseluler diikuti dengan akumulasi logam pada bagian dalam sel, sehingga dapat menghasilkan detoksifikasi (Hughes & Poole, 1989). Bioakumulasi intraseluler terjadi karena adanya makromolekul berupa peptida pengikat logam (*metal-binding*

peptida) seperti metallothioneins (MTs) dan fitokhelatin. Keduanya merupakan molekul yang digunakan oleh sel untuk mengimobilisasi ion logam karena adanya sisi pengikat dengan afinitas yang tinggi (*high affinity binding sites*) (Bae *et al*, 2001)

3. Isolasi Bakteri Pengguna Merkuri

Bakteri rhizosfer pengguna merkuri dapat kita dapatkan melalui suatu tehnik kultur diperkaya, yaitu sampel tanah di sekitar perakaran tanaman diambil satu gram. Melalui tehnik pengenceran, dan metode pour plate pada medium padat bakteri ditumbuhkan. Setelah 24 jam koloni yang muncul ditumbuhkan pada medium cair yang mengandung merkuri.

Hasil penelitian mendapatkan lima belas macam bakteri yang tumbuh pada medium mengandung 0,5 mg/l HgCl_2 dan telah berhasil diisolasi, dengan populasi sekitar $105,5 \times 10^6$ CFU/gr tanah. Diantara lima belas macam isolat bakteri tersebut hanya lima macam isolat bakteri (BRH-2; BRH-6; BRH-8; BRH-11 dan BRH-12) yang mampu tumbuh pada medium mengandung 35-50 mg/l HgCl_2 (Tabel 1). Hal tersebut membuktikan bahwa konsentrasi HgCl_2 yang tinggi menghambat pertumbuhan bakteri atau bersifat lebih toksik. Sifat toksisitas HgCl_2 tersebut menyebabkan beberapa bakteri terbunuh dan hanya lima isolat bakteri yang mampu bertahan hidup. Lima isolat bakteri tersebut

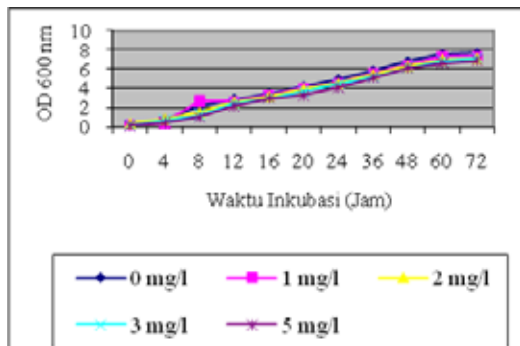
diduga mempunyai kemampuan adaptasi, meliputi adaptasi genetik dan adaptasi fisiologis.

Tabel 1. Pertumbuhan Isolat Bakteri Pada Media Salt Basal Solution cair dengan Berbagai Konsentrasi Merkuri Klorida (HgCl₂)

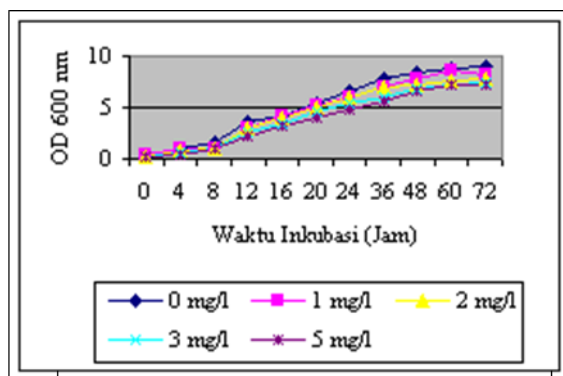
Kode Isolat	Konsentrasi HgCl ₂ (mg/l)								
	1	3	5	9	14	20	27	35	50
BRH-1	+++	++ +	+++	+++	++	++	+	+	-
BRH-2	+++	++ +	+++	+++	+++	++ +	++	++	++
BRH-3	+++	++ +	+++	+++	+++	++	+	+	-
BRH-4	+++	++ +	+++	++	++	++	+	+	-
BRH-5	+++	++ +	+++	+++	+++	++	+	+	-
BRH-6	+++	++ +	+++	+++	+++	++ +	++	++	+
BRH-7	+++	++ +	+++	+++	+++	++	++	+	-
BRH-8	+++	++ +	+++	+++	+++	++ +	+++	++	++
BRH-9	+++	++ +	+++	+++	+++	++	+	-	-
BRH-10	+++	++ +	+++	+++	+++	++	++	+	-
BRH-11	+++	++ +	+++	+++	+++	++ +	+++	++	++
BRH-12	+++	++ +	+++	+++	+++	++ ++	++	++	++
BRH-13	+++	++ +	+++	+++	+++	++	++	+	-
BRH-14	+++	++ +	+++	++	++	+	+	+	-
BRH-15	+++	++ +	+++	+++	+++	++	+	+	-

Keterangan : - : tidak tumbuh; + : tumbuh sedikit; ++ : tumbuh sedang; +++ : tumbuh banyak

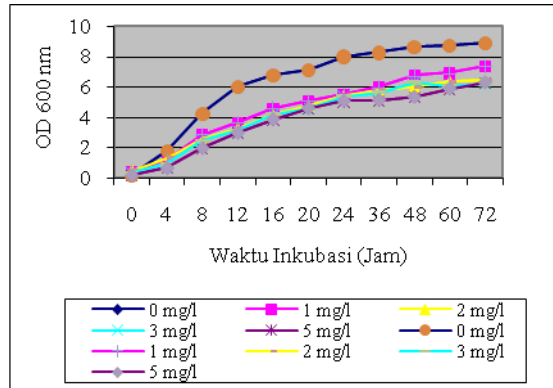
Pertumbuhan ke lima isolat bakteri terpilih menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama, meskipun tumbuh sangat lambat dan memerlukan fase lag yang cukup panjang, yaitu 4-12 jam. (Gambar 6). Kemampuan beradaptasi bakteri terhadap merkuri bervariasi tergantung jenis bakteri untuk mensintesis protein khusus yang dapat mentransformasi merkuri menjadi kurang toksik.



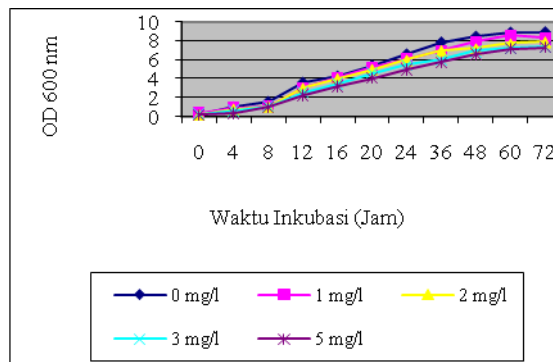
A



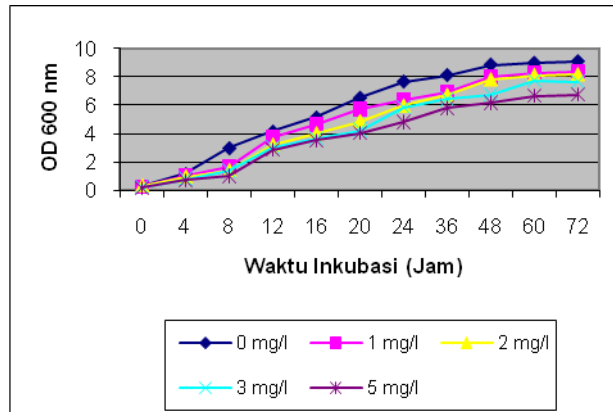
B



C



D



E

Gambar 6. Pola Pertumbuhan Isolat Terpilih Pada Medium Cair SBS yang mengandung berbagai konsentrasi HgCl_2 .

Keterangan : A = Isolat BRH-2; B = Isolat BRH-6;
C = Isolat BRH-8; D = Isolat BRH-11;
E = Isolat BRH-12

Tabel 2. Kinetika Pertumbuhan Isolat Bakteri Reisten Merkuri Klorida (HgCl_2)

Konsentrasi HgCl_2 (mg/l)	Isolat														
	BRH-2			BRH-6			BRH-8			BRH-11			BRH-12		
	G	μ	Ki	G	μ	Ki	G	μ	Ki	G	μ	Ki	G	μ	Ki
0	1.93	0.36		1.88	0.37		1.98	0.35		1.55	0.45		6.04	0.12	
1	2.06	0.34		1.99	0.35		2.36	0.32		1.73	0.41		6.05	0.11	
2	2.47	0.28	4.90	2.00	0.35	2.34	2.36	0.31	2.77	1.74	0.40	2.03	7.41	0.10	11.26
3	2.51	0.28		2.01	0.34		2.36	0.30		1.76	0.39		8.56	0.09	
5	2.72	0.25		2.03	0.34		2.41	0.29		1.81	0.39		9.65	0.07	

Keterangan : g : waktu generasi (Jam); μ : kecepatan pertumbuhan spesifik (/jam); Ki : konstanta hambatan (mg/l)

Pertumbuhan ke lima isolat dihambat oleh HgCl_2 . Merkuri klorida bersifat toksik dan menghambat pertumbuhan ke lima isolat bakteri dengan konstanta hambatan (K_i) berbeda significant. Nilai K_i menunjukkan afinitas bakteri bakteri terhadap substrat penghambat pertumbuhan. Makin rendah nilai K_i artinya semakin rendah penghambatan substrat terhadap pertumbuhan bakteri dan semakin baik kapasitas bakteri untuk tumbuh secara cepat dalam lingkungan yang mengandung substrat penghambat pertumbuhan. Nilai K_i pada masing-masing isolat uji cukup tinggi (Tabel 2)

Hal tersebut menunjukkan bahwa HgCl_2 menghambat pertumbuhan sampai pada konsentrasi tertentu dapat mematikan isolat uji.

Bakteri yang mampu bertahan hidup pada konsentrasi merkuri klorida tinggi diduga memiliki sistem enzim spesifik untuk mendetoksifikasi HgCl_2 sehingga terakumulasi dalam bentuk lain.

4. Protein Spesifik Hasil Aktivitas Bakteri Pengguna Merkuri

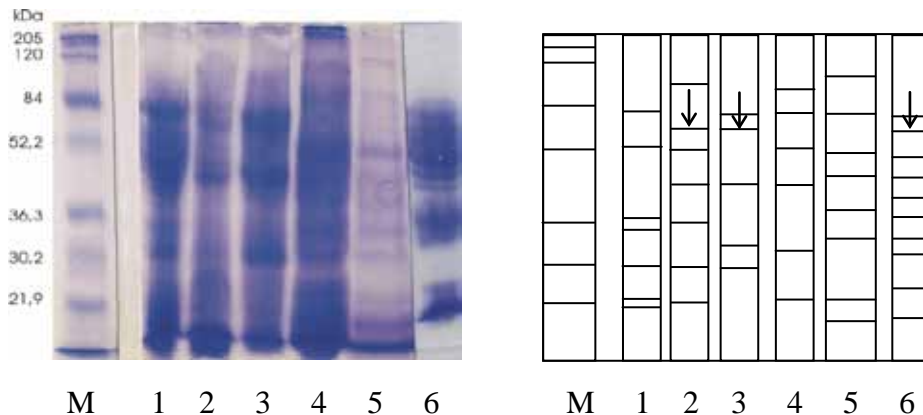
Aktivitas bakteri terhadap merkuri dapat dilihat pada elektrogram yang menunjukkan adanya protein spesifik dengan berat molekul berkisar 59 – 62 kDa (Gambar 7). Enzim protein tersebut diduga enzim merkuri reduktase yang berperan dalam proses detoksifikasi merkuri (Misra, 1992). Enzim tersebut mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Enzim tersebut bersifat inducible

hampir sama dengan merkuri reduktase pada *E.coli* strain 153-1(R831) dengan berat molekul 63.000 ± 2.000 Dalton (Schotel, 1977).

Panjang gel akrilamid sebelum dan sesudah destaining diukur, sehingga pergerakan relatif (Rf) masing-masing protein dapat dihitung menurut cara Weber dan Osbon (1969). Dengan bantuan kurva baku protein standar yang berupa hubungan logaritmik berat molekul protein standar dan nilai Rf, berat molekul enzim dapat dihitung berdasarkan persamaan :

$$Rf = \frac{\text{Jarak migrasi protein}}{\text{Jarak migrasi gel sesudah diwarnai}}$$

Hasil elektogram pada debris dari kultur isolat BRH-8, BRH-11 dan BRH-12 yang diperlakukan dengan HgCl_2 4 mg/l menunjukkan aktivitas terhadap Hg Cl_2 dengan adanya pita protein dengan berat molekul 59,62 kDa yang diduga merkuri reduktase (Gambar 8). Keberadaan pita protein dengan berat molekul sekitar 60 kDa pada debris membuktikan bahwa enzim tersebut terikat pada membran (membrane bound enzyme), khususnya pada isolat BRH-11, kecuali isolat BRH-8. Enzim tersebut diduga berperan di dalam detoksifikasi merkuri.



**Gambar 7. Elektrogram Ekstrak Bebas Sel (CFE)
dari Kultur Isolat terpilih**

Garis panah menunjukkan posisi band protein merkuri reduktase (EC 1.16.1.1)

M : Marker (protein standar BIORAD 2000)

1 : Ekstrak Bebas Sel (CFE) dari kultur BRH-12
yang tumbuh pada medium tanpa HgCl_2

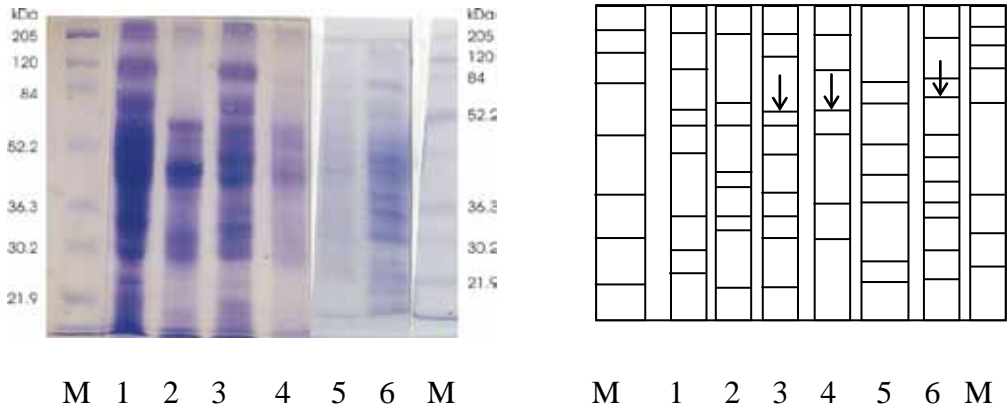
2 : Ekstrak Bebas Sel(CFE) dari kultur BRH-12
yang tumbuh pada medium dg 4 mg/l HgCl_2

3 : Ekstrak Bebas Sel (CFE) dari kultur BRH-11
yang tumbuh pada medium dg HgCl_2

4 : Ekstrak Bebas Sel(CFE) dari kultur BRH-11
yang tumbuh pada medium tanpa 4 mg/l HgCl_2

5 : Estrak Bebas Sel (CFE) dari kultur BRH-8 yang
tumbuh pada medium tanpa HgCl_2

6 : Ekstrak Bebas Sel (CFE) dari kultur BRH-8
yang tumbuh pada medium dg 4mg/l HgCl_2



Gambar 8. Elektogram Debris Sel dari Kultur Isolat Terpilih.

Garis panah menunjukkan posisi band protein merkuri reduktase (EC 1.16.1.1)

M : Marker (protein standar BIORAD 2000)

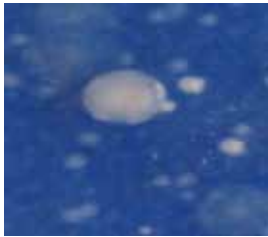
- 1 : Debris (sisas sel dan dinding) dari kultur BRH-8 yang tumbuh pada medium dg 4mg/l HgCl_2
- 2 : Debris (sisas sel dan dinding) dari kultur BRH-8 yang tumbuh pada medium tanpa HgCl_2
- 3 : Debris (sisas sel dan dinding) dari kultur BRH-12 yang tumbuh pada medium dg 4mg/l HgCl_2
- 4 : Debris (sisas sel dan dinding) dari kultur BRH-12 yang tumbuh pada medium tanpa HgCl_2
- 5 : Debris (sisas sel dan dinding) dari kultur BRH-11 yang tumbuh pada medium tanpa HgCl_2
- 6 : Debris (sisas sel dan dinding) dari kultur BRH-12 yang tumbuh pada medium dg 4 mg/l HgCl_2

5. Identifikasi Bakteri Pengguna Merkuri

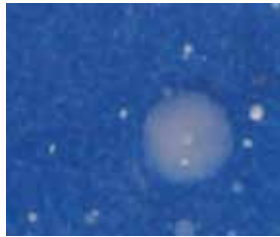
Identifikasi bakteri pengguna HgCl_2 dilakukan melalui tahap karakterisasi berbagai sifat biokimia dan kenampakan morfologi koloni dan sel. Morfologi koloni bakteri yang resisten terhadap HgCl_2 menunjukkan kenampakan morfologi koloni yang berbeda pada media tanpa merkuri dan yang mengandung merkuri (Gambar 9). Koloni bakteri pada medium yang mengandung HgCl_2 tampak lebih kasar dan tepi agak berkerut. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri berusaha untuk dapat hidup pada kondisi stress lingkungan yang toksik. Aktivitas terhadap stress lingkungan tersebut menyebabkan permukaan koloni menjadi lebih kasar dan agak berkerut.

Isolat BRH- 8 dan BRH-11 memiliki sifat yang sama, meliputi sel berbentuk batang pendek, berukuran $0,5 - 1,0 \times 0,5 - 2,4 \mu\text{m}$. Berdasarkan pewarnaan gram, sel tergolong gram positif. Koloni pada medium NA tidak berpigmen. Oksidase dan Katalase positif, indol negatif, menggunakan karbohidrat (Tabel 3 dan 4)

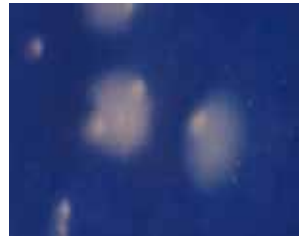
Sifat yang dimiliki isolat BRH-12, bentuk batang pendek, ukuran sel $0,5 - 1,0 \times 1,0 - 5,0 \mu\text{m}$, tidak mampu memfermentasi glukosa, laktosa, maltosa, manosa dan sukrosa tetapi hanya mengasimilasi karbohidrat tersebut untuk tumbuh pada medium Mac Conkey (Tabel 3 dan 4).



A



B



C



D



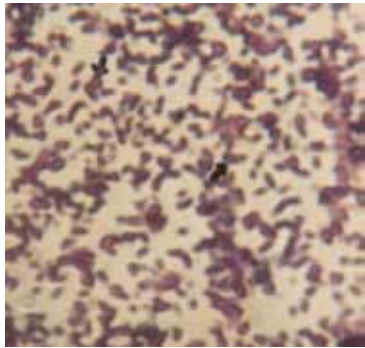
E



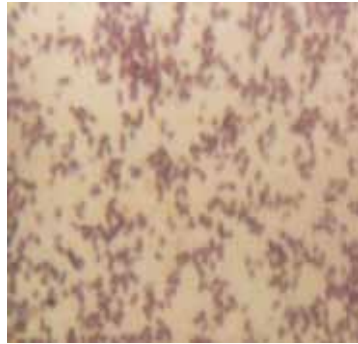
F

Gambar 9. Morfologi Koloni Isolat Terpilih yang Tumbuh pada Medium Nutrient Agar dengan/tanpa HgCl_2 setelah 2 hari inkubasi

Keterangan : A. Isolat BRH-8 tanpa HgCl_2 ;
 B. Isolat BRH-11 tanpa HgCl_2 ;
 C. Isolat BRH-12 tanpa HgCl_2 ;
 D. Isolat BRH-8 dg HgCl_2 ;
 E. Isolat BRH-11 dg HgCl_2 ;
 F. Isolat BRH-12 dg HgCl_2



A



B



C

Gambar 10. Morfologi sel isolat bakteri terpilih dengan pengecatan Gram (Perbesaran 1000x)

Keterangan : A : Isolat BRH-8;
B : Isolat BRH-11 dan
C : Isolat BRH-12

Berdasarkan karakteristik morfologi sel (Gambar 10) dan pengujian biokimia (Tabel 3 dan 4)) serta mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, diduga bahwa isolat BRH-8 dan BRH-11 adalah *Bacillus* (Gambar 10 A dan 10 B), sedangkan isolat BRH-12 adalah *Pseudomonas* (Gambar 10 C).

AGENSIA HAYATI

Mikroorganisme di daerah rhizosfer, ada yang bermanfaat, tetapi ada juga yang merugikan khususnya di bidang pertanian. Mikroorganisme di sekitar rhizosfer banyak juga yang bersifat sebagai patogen tanaman. Untuk menekan kerugian di bidang pertanian akibat patogen ini banyak dilakukan pemberantasan, baik secara fisik, kimia maupun biologis.

Akhir-akhir ini cara biologis dianggap paling aman, yaitu menggunakan mikroorganisme lain yang bersifat antagonis terhadap patogen, sehingga diharapkan patogen tidak dapat berkembang dengan adanya mikrobial yang lain (agensia hayati).

Kelompok *Pseudomonas fluorescens* dan *Actinomycetes* banyak diteliti sebagai agensia hayati. Hasil penelitian menunjukkan kedua kelompok mikroorganisme tersebut cukup efektif untuk beberapa jenis patogen.

Genus *Pseudomonas* banyak hidup di akar tanaman (Pinton *et al*, 2001). Sebagian besar rhizobakteria seperti strain *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* dan *Bacillus* membantu pertumbuhan tanaman, karena memproduksi zat tumbuh seperti IAA (indoleacetic acid), giberelin dan sitokinin. Kehadiran zat-zat tersebut di rhizosphere membantu pertumbuhan tanaman (Brimecombe *et al*, 2001).

Soesanto (1990) dan Brimecombe *et al* (2001) menyatakan bahwa, *Pseudomonas* salah satu kelompok bakteri yang mensintesa zat tumbuh dalam rhizosfer, dan keberadaannya membantu perkembangan biji berkecambah dan membantu pembentukan akar tanaman.

Bakteri rhizosfer banyak macam dan manfaatnya, walaupun ada juga yang merugikan, baik terhadap manusia, tanaman, hewan maupun lingkungan. Beberapa bakteri rhizosfer telah diteliti mempunyai kemampuan sebagai pereduksi merkuri, sehingga toksisitas merkuri yang terserap akar tanaman sudah berkurang toksisitasnya. Penelitian yang lain juga telah membuktikan bahwa ada bakteri yang mempunyai kemampuan sebagai agensia hayati untuk menekan perkembangan bakteri yang patogen terhadap tanaman, diantaranya kelompok *Pseudomonad fluorescens* yang bersifat antagonis terhadap *R solanacearum* penyebab layu bakteri (bacterial wilt).

Berdasarkan uraian di atas maka timbulah pemikiran apakah satu jenis mikroorganisme dapat mempunyai lebih dari satu potensi di alam ini. Misalkan satu mikrobia dapat sebagai pereduksi logam berat atau sebagai agensia remediasi lingkungan dan bisa juga sebagai agensia hayati. Oleh karena itu bakteri-bakteri yang telah teruji berpotensi sebagai agensia remediasi logam merkuri diujikan

sebagai agensia hayati. Pada kesempatan ini patogen yang digunakan adalah penyebab layu bakteri pada tanaman kentang.

1. Layu bakteri

Pseudomonas solanacearum atau *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu bakteri patogen yang banyak terdapat di daerah rhizosfer berbagai macam tanaman, terutama famili solanaceae. Bakteri tersebut menyebabkan penyakit layu bakteri pada beberapa jenis tanaman, diantaranya tanaman kentang.

Layu bakteri disebabkan oleh *R. solanacearum* merupakan penyakit penting pada produksi kentang di dunia dan menjadi problem utama di negara produksi kentang yang beriklim tropis, seperti Indonesia (Semangun, 1994; Wall, 2000). *R. solanacearum* merupakan patogen tular tanah dan secara genetis patogen ini mudah menyesuaikan diri, karena itu mempunyai range inang yang banyak, sehingga sulit dikontrol secara kimia.

Gejala layu bakteri pada kentang, umumnya pertama kali terlihat pada tanaman yang berumur lebih kurang 6 minggu. Daun-daun layu, biasanya dimulai dari daun-daun muda (ujung). Jika batang dipotong, terlihat berkas pembuluhnya berwarna coklat. Pada serangan lanjut, bila pangkal batang dipotong dan ditekan akan keluar cairan berwarna putih keabuan yang merupakan massa bakteri (Semangun, 1994).

Tanaman famili Solanaceae seperti tomat, terong, cabe, kentang dan tembakau mudah terserang patogen penyebab layu bakteri. Tanaman yang terinfeksi menunjukkan layu dan pada akhirnya mati, bila dibelah dalam jaringan batang terjadi diskolorisasi (Wall, 2000).

Kemampuan *R. solanacearum* untuk dapat bertahan hidup tanpa menunjukkan gejala infeksi pada akar gulma sebagai inang alternatif, atau pada tanaman yang diperkirakan bukan inang serta luasnya kisaran inang mengakibatkan sulitnya pengendalian penyakit dengan rotasi tanaman (Persley, 1985). Pengendalian biologi menggunakan mikroorganisme antagonis untuk meminimalkan penggunaan bahan kimia dalam sistem pengendalian terpadu penyakit tanaman, menjadi lebih penting akhir-akhir ini (Mao *et al.*, 1997).

2. Pengendalian Hayati

Pengendalian biologi menggunakan mikroorganisme antagonis saja atau gabungan untuk meminimalkan penggunaan pestisida kimiawi dalam sistem pengendalian terpadu penyakit tanaman, menjadi lebih penting akhir-akhir ini. Antagonistik bakteri dan jamur diaplikasikan sebagai perlakuan benih terutama untuk pengendalian patogen terbawa tanah (Mao *et al.*, 1997).

Kelompok bakteri pseudomonad fluoresen telah banyak diteliti dan terbukti beberapa strainnya mampu menghambat

perkembangan *R. solanacearum* (Fukui et al., 1994). Disamping itu hasil penelitian yang lain menunjukkan bahwa bahwa bakteri dari genus *Pseudomonas* dan *Bacillus* mempunyai kemampuan mereduksi logam berat merkuri pada sistem perakaran persemaian gulma *C. gigantea* (Prasetyawati, 2005).

R. solanacearum termasuk patogen yang menginfeksi akar melalui luka yang disebabkan oleh pemindahan bibit, serangga, nematoda dan luka alami yang menyebabkan kerusakan pada akar. Layu bakteri terjadi 2 – 5 hari setelah infeksi, tergantung pada kerentanan inang, temperatur dan virulensi patogen. Infeksi dan perkembangan penyakit didukung oleh temperatur tinggi (optimum 30-35⁰C dan kelembaban tinggi). Serangan bakteri *R. solanacearum* ini sangat sulit dikendalikan karena selain sangat luasnya kisaran inang dan sebarannya juga karena bakteri ini bisa bertahan dalam tanah untuk jangka waktu yang cukup lama (Jones et al., 1991).

Beberapa inang yang tidak diketahui sebelumnya termasuk kultivar tanaman gulma, mungkin mempertinggi populasi *R. solanacearum*, dan ini mungkin memperlama waktu hidup bakteri di dalam tanah (Jones et al, 1991). Daya hidup bakteri di dalam tanah memperpanjang periode/waktu dalam kondisi tidak ada tanaman inang. Periode hidup sangat bervariasi tergantung pada ras, dan biologi tanah. Tanah dengan drainase baik dan sifat penyimpanan air yang mendukung untuk hidup bakteri. Kondisi

tanah yang meningkatkan daya hidup bakteri adalah temperatur sedang sampai tinggi dan pH rendah sampai sedang. Tanah yang mendukung organisme antagonis menghambat bakteri untuk hidup (Jones, *et al.*, 1991).

Kentang merupakan salah satu tanaman sayuran yang banyak dikembangkan di Indonesia, karena potensial untuk meningkatkan pendapatan petani. Pusat produksi kentang di Indonesia adalah Lembang dan Pengalengan (Jawa Barat), Wonosobo dan Magelang (Jawa Tengah), Malang (Jawa Timur), Berastagei (Sumatera Utara). Umumnya hasil produksi tersebut diekspor ke Singapore dan Malaysia.

3. Isolasi Patogen

Patogen (*Ralstonia solanacearum*) diisolasi dari tanaman kentang yang menunjukkan gejala layu. Kelayuan dimulai dari daun termuda nampak merunduk (gambar 11), ketika batang tanaman dibelah nampak berkas pembuluh berwsarna kecoklatan dan apabila dipotong melintang nampak eksudat berwarna putih kotor atau kekuningan . Menurut Semangun (1994) gejala layu bakteri pada tanaman kentang, umumnya pertama kali terlihat pada tanaman berumur kurang lebih 6 minggu. Daun-daun layu, biasanya dimulai dari daun-daun muda (ujung). Jika batang dibelah, terlihat berkas pembuluhnya berwarna coklat. Pada serangan lanjut bila pangkal; batang dipotong dan ditekan akan

keluar cairan berwarna putih keabuan yang merupakan masa bakteri.



Gambar 11. Tanaman kentang yang menunjukkan gejala layu bakteri.

Hasil isolasi pada media TTC (Triphenyl Tetrasodium Chloride), menunjukkan koloni kebasahan, berwarna putih dan setelah lima hari, bagian tengahnya berwarna merah jambu (gambar 12). Bakteri ini mempunyai banyak ras dan dapat diisolasi dengan baik pada medium yang mengandung 2, 3, 5 trifenil-tetra sodium klorida (Anonim, 2000).



Gambar 12. Koloni Bakteri *R. solanacearum* pada Medium TTC umur 5 hari.

4. Uji Antagonis

Dari 15 isolat yang telah teruji sebagai bakteri pengguna merkuri, 5 isolat terpilih sebagai isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi merkuri klorida tinggi. Lima isolat tersebut diremajakan kembali pada medium Nutrien Agar miring pada tabung reaksi (Gambar 13)

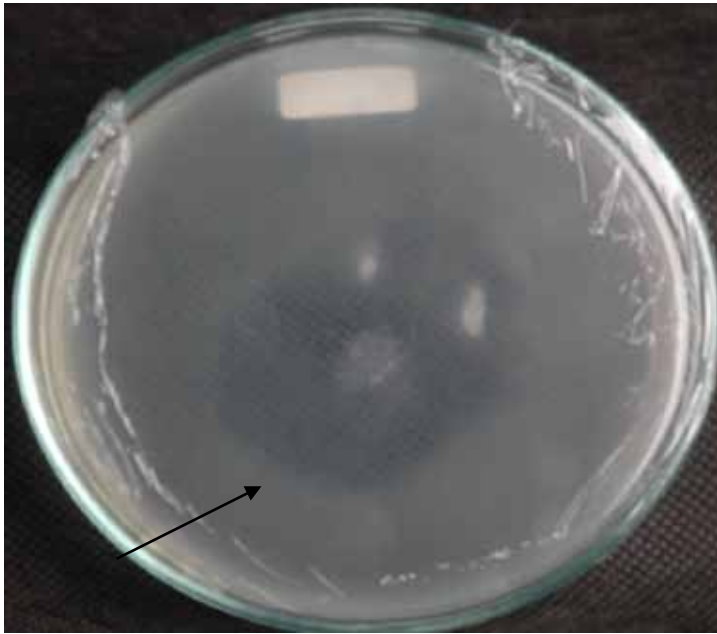
Setelah isolat bakteri pengguna merkuri dan isolat patogen siap, maka dilakukan uji antagonis, dengan cara isolat bakteri pengguna merkuri dimasukkan pada medium nutrisi agar dan dituangkan pada cawan petri. setelah memadat maka isolat patogen

diinokulasikan pada tengah cawan petri. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam sampai 48 jam.



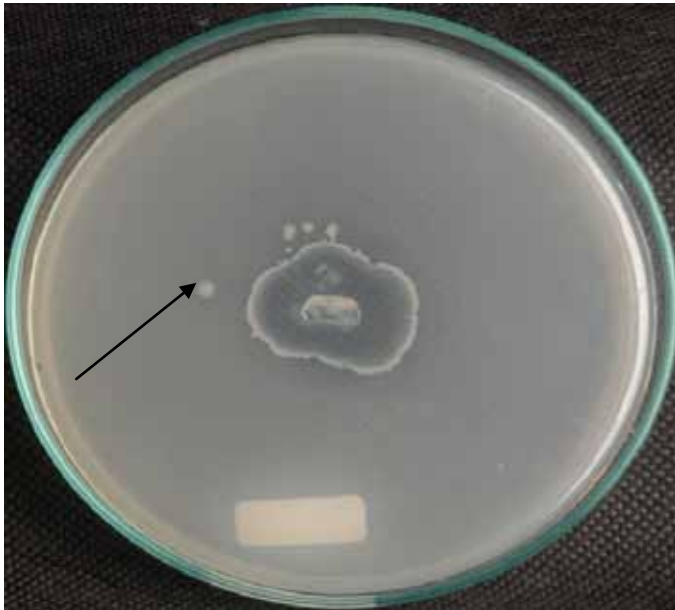
Gambar 13. Lima Isolat Bakteri Pengguna Logam Merkuri Pada Medium Nutrien Agar Miring

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari lima isolat yang diuji hanya dua isolat yang mampu menunjukkan daerah penghambatan, yaitu isolat 3 (BRH 8) (gambar 14) dan isolat 1 (BRH 12) (gambar 15).



Gambar 14. Uji Antagonis Isolat 3 (BRH 8) Dengan *R. solanacearum* secara in vitro.

Isolat BRH 8, berdasarkan hasil identifikasi (Gambar 10A dan tabel 3 dan 4) adalah termasuk genus *Bacillus*. Sedangkan isolat BRH-12 adalah genus *Pseudomonas*. Menurut Misra (1992) Beberapa genus bakteri yang resisten terhadap merkuri ada yang gram positif diantaranya, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* dan *Streptomyces*, sedangkan yang gram negatif, diantaranya *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Yersinia*, *Acinetobacter* dan *Alcaligenes*



Gambar 15 Uji Antagonis Isolat 1 (R1) dengan *R. solanacearum* secara in vitro.

Genus *Pseudomonas* termasuk bakteri gram negatif, ada yang fluorescense, ada juga yang tidak fluorescense. Kelompok ini banyak hidup di akar tanaman (Pinton *et al*, 2001). Sedangkan *Bacillus* termasuk bakteri gram positif, dan mampu membentuk tunas, banyak tumbuh di daerah rhizosfer. Sebagian besar rhizobakteria seperti strain *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* dan *Bacillus* membantu pertumbuhan tanaman, karena memproduksi zat tumbuh seperti IAA (indoleaceticacid),

giberilin dan citokinin. Kehadiran zat-zat tersebut di rhizosphere membantu pertumbuhan tanaman (Brimecombe *et al*, 2001).

Hasil penelitian terdahulu menyatakan bahwa, kelompok bakteri *Pseudomonas* dan *Bacillus* mampu menekan perkembangan *Rasltonia solanacearum*. Disamping itu ke dua genus tersebut juga diketahui mampu membongkar DDT menjadi DDD (Rao, 1994).

KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri-bakteri pengguna logam merkuri (Genus *Bacillus* dan *Pseudomonas*) ada yang bersifat antagonis terhadap patogen *Ralstonia solanacearum* secara in vivo.

DAFTAR PUSTAKA

- Bae, W., R.K. Mehra; A. Mulchandani and W. Chen. 2001. Geneic Engineering of E. coli for Enhanced Uptake and Bioaccumulation of Mercury. *Applied and Envinmental Microbiology*. 67 (11) ; 5335 – 5338.
- Barkay, T. 1992. Mercury Cycle, Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. Inc. London
- Brimecombe, M.J.; Frans, A.DL.; James, ML. 2001. The Effect of Root Exudates on Rhizosphere Microbial Populations. Dalam *The Rhizosphere*. Ed. R. Pinton; Zeno, V and Paolo, N. Mercel Dekker Inc. New York – Bassil. Pp : 95 – 140.
- Gadd, G.M. 1990. Metal Tolerance in Microbiology of Extreme Environments. C. Edwards Ed, Open University Press, Millon Keynes, p : 178 –192
- _____. 2000. Heavy Metal Pollutants; Environmental and Biotechnological Espect. *Encyclopedia of Microbiology 2 nd*. Ed 2 : 607 –617.
- Huang, J.W. and S.D. Cunningham. 1996. Lead Phytoextraction : Species Variation in Lead Uptake And Translocation. *New Phytol*. 134 : 1 – 10.
- Hughes, M.N. and R.K. Poole. 1989. Metals and microorganism. Chapman and Hall. London.
- Jones, J.B.; Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. 1991, *Compendium of Tomato Diseases*. APS Press. 100h.

- Madigan, M.T; Martinko, J.M.; Parker, J. 2000. Brock Biology of Microorganisms Southern Illionois University Carbondale, Prentice Hall International; Inc. United States of America
- Mao, W., Lewis, J.A., Hebbar, P.K., & Lumsden, R.D. 1997. Seed Treatment with a Fungal or a Bacterial Antagpnist for Reducing Corn Damping –off Caused by Species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis.* 82 : 450-454.
- Misra, T.K, 2000. Heavy Metals Bacterial Resistances. *Encyclopedia of Microbiology*, 2nd Ed. 2. ; 618-627.
- Moat, A.G.; Foster, J.W. dan Spector, M.P., 2002. Microbial Physiology. Wiley-Liss, New York. Fourth Edition; 2 – 3.
- Pinton, R.; Veranini, Z. and Nannipieri, P. 2001. The Rhizosphere as a Site of Biochemical Interactions Among Soil Components, Plant, and Microorganisms. Marcel DEKKER, Inc. New York.
- Prasetyawati, E.T., 2005. Peran Bakteri Rhizosfer Terhadap Detoksifikasi Merkuri Pada Persemaian *Calotropis gigantea* L. Tesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Rao, S.M.S. 1994. Mikroorganisme tanah dan Pertumbuhan Tanaman. UI Press. Jakarta. Edisi ke dua.
- Salt, D.E.; M. Blaylock; N.P.B.A. Kumar; V. Dushenkov; B.D. Ensley; I. Chet and I. Raskin. 1995. Phytoremediation : A Novel Strategy for Removal of Toxic Metals From The Environment Using Plants. *Biotechnology Vol 13 May 1995*. P : 468 – 473.
- Semangun, H. 1994. *Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Soesanto. 1990. *Interaksi antara Mikrobia dan Tumbuhan*. Kursus Singkat Ekologi Mikrobia. Pau Bioteknologi UGM. Yogyakarta.
- Wall, G.C. 2000. Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) (syn. *Burkholderia*, *Pseudomonas solanacearum*). *ADAP 2000-2, Reissued August 2000*. P: 1-5